

**Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Vergleichende Untersuchungen zur Al-
buminbindung oraler Antikoagulantien**

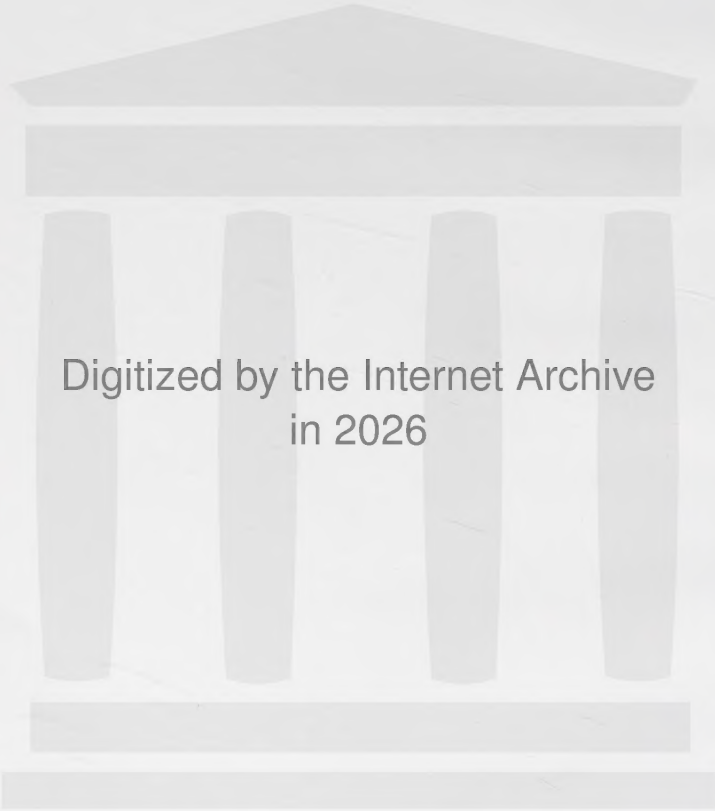
INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen**

vorgelegt von

Holger Stamm
aus Salzgitter-Bad

Mainz 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552610_0065

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vergleichende Untersuchungen zur Al-
buminbindung oraler Antikoagulantien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Holger Stamm
aus Salzgitter-Bad

Mainz 1974



Fachbereichsdekan:

Professor Dr. P. Klein

Referent:

Professor Dr. G. Kuschinsky

Korreferent:

Professor Dr. Dr. J. Krieglstein

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I Einleitung	1
II Material und Methodik	3
1) Bestimmung der Eiweißbindung mit der Gelfiltration	3
2) Bestimmung des Verteilungskoeffizien- ten	5
3) Bestimmung der Arzneimittel	6
4) Statistische Auswertungsmethoden	8
5) Definition der verwendeten Größen	9
III Versuchsergebnisse	12
1) Eiweißbindung der Cumarinderivate	12
2) Verteilungskoeffizient der Cumarinderivate	17
3) Statistische Auswertung der Ergeb- nisse	21
IV Diskussion	22
V Tabellen	27
VI Zusammenfassung	30
VII Literaturverzeichnis	32
Lebenslauf	

E I N L E I T U N G

Zahlreiche Arzneimittel werden nach Eintritt in die Blutbahn in unterschiedlichem Maße an Plasmaproteine gebunden. (GOLDSTEIN, 1949; DESGREZ u. DE TRAVERSE, 1966; ALY et al., 1968; MEYER u. GUTTMANN, 1968; KRIEGLSTEIN, 1969a).

Da nur der freie, nicht an Eiweiß gebundene Anteil biologische Membranen passieren kann und pharmakologisch wirksam ist (BRODIE u. HOGBEN, 1957), können durch das Ausmaß der Bindung Verteilung, Wirksamkeit und Ausscheidung der Arzneimittel beeinflusst werden (WITZGALL, 1953; BRODIE u. HOGBEN, 1957; NEWBOLD u. KILPATRICK, 1960; ANTON, 1960, 1961; BÜNGER u. KOCH, 1961; DETTLI, 1961; PORTWICH u. BÜTTNER, 1961; DETTLI et al., 1963; ANTON 1964; WITZGALL u. BOYENS, 1964; THORP, 1964; BRODIE, 1965; BRODIE, 1967; KRIEGLSTEIN, 1969b; PRESCOTT, 1969).

Cumarinderivate besitzen eine große Affinität zum Albuminmolekül (O'REILLY, 1969; CHIGNELL, 1970; CHO et al., 1971; GARDEN u. WOISILAIT, 1971; O'REILLY, 1971).

Obwohl sie in prinzipiell gleicher Weise wirken (Hemmung der Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X in der Leber), unterscheiden sie sich hinsichtlich der Wirksamkeit, der Wirkungsdauer und der Geschwindigkeit ihrer Ausscheidung aus dem Organismus (WEINER et al., 1954; COON u. WILLIS, 1970; O'REILLY, 1970).

Diese Unterschiede könnten zum Teil durch eine unterschiedliche Plasmaalbuminbindung bedingt sein.

Da die in der Literatur vorhandenen Bindungsdaten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen gewonnen wurden (O'REILLY, 1969; CHO et al., 1971; O'REILLY, 1971), sollte in der vorliegenden Arbeit die Albuminbindung der in der Therapie verwendeten Cumarinderivate vergleichend untersucht werden. Aus den Beziehungen zwischen chemischer Struktur der Cumarinderivate, ihren hydrophoben Eigenschaften und dem Ausmaß ihrer Bindung an Albumin sollte weiterhin Aufschluß über die Natur des Cumarin-Albumin-Komplexes gewonnen werden.

M A T E R I A L u n d M E T H O D I K

Folgende Substanzen wurden verwendet:

Acenocoumarol (Sintrom, Geigy), Phenprocoumon (Marcumar, Roche), Warfarin-Natrium (Coumadin, Iptor Pharmazeutische Präparate AG), Ethylbiscoumacetat (Tromexan, Geigy), Dicumarol (Dicumarol, Schuchart). Serumalbumin vom Rind (trocken, reinst, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %, Behringwerke, Marburg).

Standardpufferlösung (0,02 M Phosphatpuffer nach Sørensen, der zusätzlich 0,9 % NaCl enthielt). Die Strukturformeln der untersuchten Substanzen sind in Tabelle 1 dargestellt.

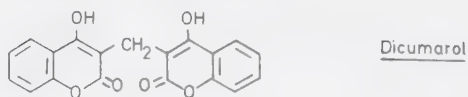
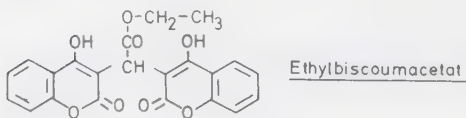
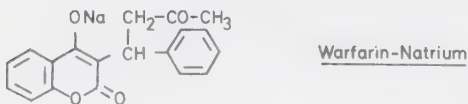
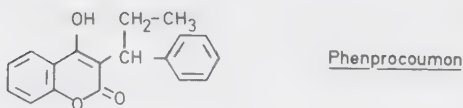
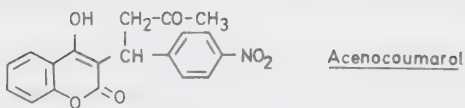
Bestimmung der Eiweißbindung mit der Gelfiltration:

Die Eiweißbindung der Cumarinderivate wurde mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration bestimmt (KRIEGLSTEIN u. KUSCHINSKY, 1968).

Im chromatographischen Prozeß der Gelfiltration wird der freie Arzneimittelanteil vom Albumin und dem Arzneimittel-Albumin-komplex aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße abgetrennt. Bedingt durch die Porengröße des Sephadexgels kann nur der freie Arzneimittelanteil in die Gelporen eindringen und wird dadurch in seiner Wanderungsgeschwindigkeit gehemmt.

Tabelle 1

Strukturformeln der untersuchten
Substanzen.



Die nicht an Albumin gebundene Substanz wird aus der schneller wandernden Eiweißzone in einer Konzentration herauschromatographiert, die dem freien Arzneimittel im Gleichgewichtszustand entspricht. Nachdem das Albumin zusammen mit dem albumingebundenen und einem Teil des freien Pharmakons die Säule passiert hat, wird die Gleichgewichtskonzentration an freiem Arzneimittel von der Säule eluiert.

In den vorliegenden Versuchen wurden 18 ml eines auf pH 7,4 eingestellten Lösungsansatzes (Digitalmeter Digi 610, Wiss.-Techn. Werkstätten Weilheim) auf eine Sephadexsäule (G50 fine, Chromatographierohre aus braunem Glas) von 20 cm Länge und 1,2 cm Durchmesser aufgetragen. Der Lösungsansatz enthielt das Arzneimittel und Albumin in Standardpuffer. Die Säule wurde mit Standardpufferlösung pH 7,4 und einer Durchflußgeschwindigkeit von 18 ml/Std. bei Zimmertemperatur eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 3 ml aufgefangen.

Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der verwendeten Pharmaka wurde das Octanol-Puffer-System nach HANSCH (1962) verwendet.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Octanol mit Standardpufferlösung und Standardpufferlösung mit n-Octanol gesättigt. Zur octanolgesättigten Standardpufferlösung wurden die zu untersuchenden Pharmaka in Konzentrationen von jeweils 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; und $1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ zugesetzt. Für Dicumarol wurden infolge der begrenzten Löslichkeit in Standardpuffer nur Konzentrationen bis einschließlich $0,8 \times 10^{-4} \text{ M}$ untersucht.

Nach dem Zusetzen der Pharmaka zur Standardpufferlösung wurde der pH-Wert kontrolliert und auf pH 7,4 eingestellt. Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten wurden jeweils 20 ml der arzneimittelhaltigen Standardpufferlösung mit 1 ml puffer-gesättigtem Octanol 60 Minuten mit 150 U/min. maschinell aus-geschüttelt, anschließend 5 Minuten mit 2500 x g zentrifu-giert und das Octanol quantitativ abgehoben und verworfen. Die Konzentration der Arzneimittel in der Standardpufferlösung wurde vor und nach dem Ausschütteln gemessen.

Die Konzentration des Pharmakons in der organischen Phase wur-de als Differenz zwischen der Ausgangskonzentration und der Konzentration in der wäßrigen Phase nach dem Ausschütteln er-mittelt. Der Verteilungskoeffizient P errechnete sich aus der Arzneimittelkonzentration in der organischen Phase und der Konzentration in der wäßrigen Phase.

Bezeichnung, Symbol, Dimension und Ermittlung der zur Charakte-risierung der Eiweißbindung und des Verteilungskoeffizienten verwendeten Größen sowie die für die statistische Auswertung benutzten Parameter sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Bestimmung der Arzneimittel

Die Bestimmung der Arzneimittel erfolgte nach der Extraktion der Pharmaka aus der Puffer- oder Eiweißlösung durch die Mes-sung der UV-Absorption (Beckmann DB Spektrophotometer).

Dazu wurde zunächst die Ausbeute der Extraktion aus der Albumin- und der Standardpufferlösung in dem untersuchten Konzentrationsbereich bestimmt. Mit n-Heptan (gereinigt durch Ausschütteln mit 1N HCl, 1N NaOH und 2 x aqua dest.) ließen sich Phenprocoumon und Ethylbiscoumacetat bei pH 1 vollständig aus der Eiweiß- und Pufferlösung extrahieren, Warfarin-Natrium bei pH 1 zu 70 %. Acenocoumarol konnte durch Extraktion mit n-Heptan, das 1,5 Vol. % Isoamylalkohol enthielt, zu 93 % bei pH 1 extrahiert werden. Zur Extraktion von Dicumarol mit n-Heptan wurden die Proben mit Citrat-Phosphat-Puffer (1,5 M) auf pH 3,2 eingestellt. Dicumarol wurde bei diesem pH vollständig extrahiert. Auch hier bestanden keine Unterschiede in der Ausbeute der Extraktion zwischen Puffer- und Eiweißlösung.

Zur Bestimmung der untersuchten Arzneimittel wurden jeweils 1 - 2 ml der Probenlösungen mit 2 ml aqua dest. verdünnt, dann mit 0,5 ml 3 N HCl angesäuert und in 10 ml der oben angeführten Lösungsmittel durch 30 minütiges Schütteln extrahiert. Anschließend wurde 4 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert. 5 ml der organischen Phase wurden abgehoben und mit 2 ml 2,5 N NaOH ausgeschüttelt. Nach dem Abheben und Verwerfen der organischen Phase wurde die Absorption der wäßrigen Phase im Photometer gegen 2,5 N NaOH bei folgenden Wellenlängen gemessen:

Acenocoumarol (298 mμ), Phenprocoumon (305 mμ),
Warfarin-Natrium (310 mμ), Ethylbiscoumacetat (308 mμ)
und Dicumarol (316 mμ).

Zur Bestimmung von Dicumarol wurden die Probenlösungen mit 2,5 ml Citrat-Phosphat-Puffer (1,5 M) auf pH 3,2 eingestellt. Ansonsten wurde wie oben beschrieben extrahiert und gemessen.

Statistische Auswertungsmethoden

Die Ergebnisse der Bestimmung der Eiweißbindung der Cumarinderivate und der Octanol-Pufferverteilung wurden zunächst der Rangvarianzanalyse nach FRIEDMAN (FRIEDMAN, 1937) unterworfen. Mit diesem Test wurde für jede verwendete Arzneimittelkonzentration geprüft, ob zwischen den untersuchten Cumarinderivaten hinsichtlich der freien Arzneimittelkonzentration α und des Octanol-Pufferverteilungskoeffizienten P Unterschiede vorhanden sind.

Zur Feststellung, zwischen welchen Präparaten und bei welcher Arzneimittelkonzentration sich diese Unterschiede befinden, wurde der Test nach WILCOXON (WILCOXON, F., WILCOX, R.A., 1964) angeschlossen. Bei der Prüfung der Ergebnisse der Octanol-Pufferverteilung wurde Dicumarol in diesen Test nicht miteinbezogen, da es einen wesentlich größeren Verteilungskoeffizienten hatte, als die übrigen Substanzen (siehe Tab. 4).

Tabelle 2

Bezeichnung, Symbol, Dimension und Ermittlung der zur Charakterisierung der Eiweißbindung, des Verteilungskoeffizienten und der statistischen Auswertung verwendeten Größen.

Bezeichnung	Symbol	Dimension	Ermittlung
Gesamtkonzentration der Cumarinderivate	c	M	Einwaage
Konzentration an freier Substanz	c_f	M	Analyse
Konzentration an gebundener Substanz	c_g	M	$c_g = c - c_f$
Albuming Gesamtkonzentration	c_p	M	Einwaage
Prozentualer Anteil an freier Substanz	α	%	Analyse
Prozentualer Anteil an gebundener Substanz	β	%	$\beta = 100 - \alpha$

Fortsetzung Tabelle 2

Bezeichnung	Symbol	Dimension	Ermittlung
Spezifisches Bindungsvermögen	$\bar{r}$	M/M	$\bar{r} = c_g / c_p$
Bindungskonstante	K	l/M	$\lim_{c_f \rightarrow 0} \bar{r}/c_f = \sum_{i=1}^n \frac{n_i \cdot k_i}{1 + k_i \cdot c_f} = K$
Anzahl der Bindungsstellen pro Albuminmolekül	n	-	$\lim_{c_f \rightarrow \infty} \bar{r} = \sum_{i=1}^n \frac{n_i \cdot k_i \cdot c_f}{1 + k_i \cdot c_f} = n$
Freie Reaktionsenergie	ΔF^0	kcal/Mol	$\Delta F^0 = -RT \cdot \ln K$
Universelle Gaskonstante	R	cal/M°grad	1,9865
Absolute Temperatur	T	°K	Messung
Verteilungskoeffizient	P	-	$P = c_o / c_w$
Arzneimittelkonzentration in der wäßrigen Phase (vor Ausschütteln mit Octanol)	c_w^0	M	Einwaage

Fortsetzung Tabelle 2

Bezeichnung	Symbol	Dimension	Ermittlung
Arzneimittelkonzentration in der wäßrigen Phase (nach Ausschütteln mit Octanol)	c_w	M	Analyse
Arzneimittelkonzentration in der organischen Phase	c_o	M	$c_o = c_w^o - c_w$
Mittelwert	$\bar{x}$	-	$\frac{\sum x}{N}$
Standardabweichung des Mittelwertes	$s_{\bar{x}}$	-	$\frac{\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}}{\sqrt{N}}$
Irrtumswahrscheinlichkeit	p	%	Friedman-Test und multipler Vergleich von WILCOXON und WILCOX
Anzahl der Beobachtungen	N	-	Auszählen

E r g e b n i s s e

Bestimmung der Eiweißbindung der Cumarinderivate

Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit des prozentualen Anteils an freiem Arzneimittel von der Gesamtkonzentration der untersuchten Substanzen. Für alle untersuchten Cumarinderivate nimmt im angegebenen Konzentrationsbereich der prozentuale Anteil an freier Substanz mit steigender Gesamtkonzentration zu. Während der prozentuale Anteil an freiem Dicumarol nur auf das etwa 1,5fache ansteigt, zeigen alle anderen untersuchten Arzneimittel einen Anstieg auf das 2,5 bis 5fache gegenüber der niedrigsten untersuchten Konzentration.

Die Darstellung der Versuchsergebnisse nach SCATCHARD (1949) läßt sich für alle Substanzen in dem untersuchten Konzentrationsbereich durch Geraden beschreiben (Abb. 2). Der extrapolierte Schnittpunkt dieser Geraden mit der Ordinate ergibt die Bindungskonstante K, der extrapolierte Schnittpunkt mit der Abszisse die Anzahl n der Bindungsstellen pro Albuminmolekül.

Die Bindungskonstante K und die freie Reaktionsenergie nehmen in der Reihenfolge Dicumarol, Ethylbiscoumacetat, Phenprocoumon, Warfarin - Natrium und Acenocoumarol ab. Auch die Anzahl der Bindungsstellen scheint sich mit abnehmender Bindungskonstante zu verringern (Abb. 2, Tab. 3).

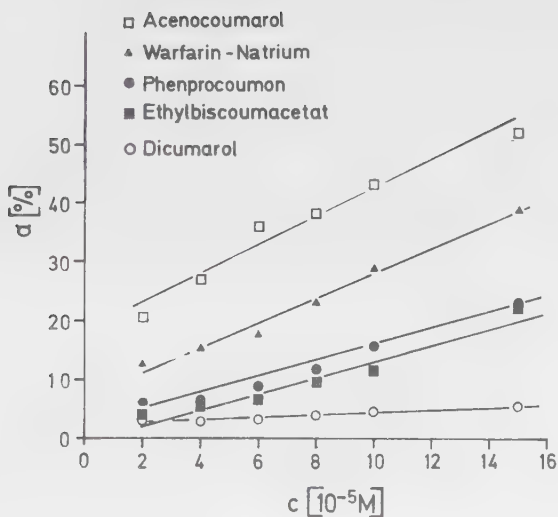


Abbildung 1

Bindungsvermögen einer Albuminlösung
($5 \times 10^{-5} \text{M}$) für Cumarinderivate. Abhängig-
keit des prozentualen Anteils an freier Sub-
stanz (Ordinate) von der Gesamtkonzentration
der Cumarinderivate (Abszisse). Die Punkte
auf den Geraden stellen Mittelwerte aus
3 - 5 Bestimmungen dar (s. Tab. 5).

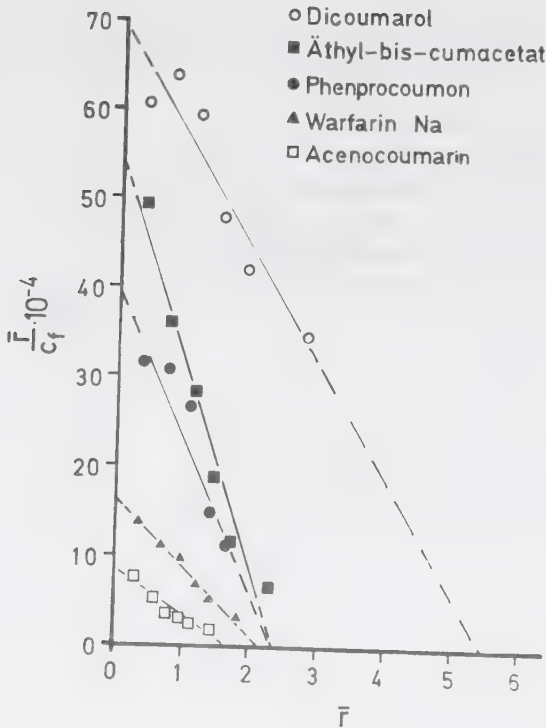


Abbildung 2

Bindungsvermögen einer Albuminlösung ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) für Coumarinderivate. Darstellung nach SCATCHARD, 1949. Abhängigkeit des Quotienten $\bar{r}/c_f$ (in 10^4L/M ; Ordinate) von dem spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (in M/M ; Abszisse). Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3 - 5 Bestimmungen (s. Tab. 5).

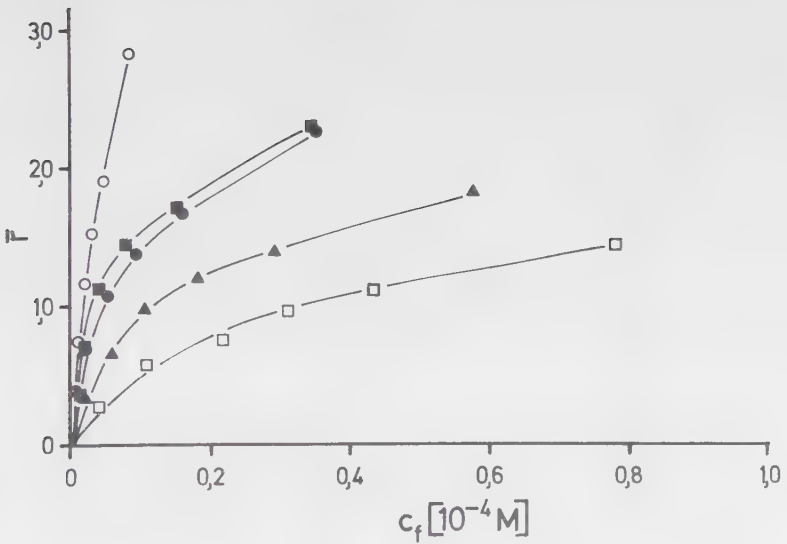


Abbildung 3

Bindungsvermögen einer Albuminlösung ($5 \times 10^{-5} M$) für Coumarinderivate. Abhängigkeit des spezifischen Bindungsvermögens $\bar{r}$ (in M/M; Ordinate) von der Konzentration an freier Substanz c_f (Abszisse). Die dargestellten Meßpunkte sind Mittelwerte aus 3 - 5 Bestimmungen (s. Tab. 5).
○ Dicumarol, ■ Ethylbiscoumacetat, ● Phenprocoumon, ▲ Warfarin-Natrium, □ Acenocoumarol.

Tabelle 3

Bindungsvermögen einer Albuminlösung ($5 \times 10^{-5} \text{M}$) für Coumarinderivate und deren Verteilung zwischen Octanol und Puffer.
 Angegeben sind α , β (für $c=10^{-4} \text{M}$), K , n , nK , ΔF^0 und P
 (Definition s. Tab. 2).

Arzneimittel	α %	β %	K 10^4 l/M	n	nK	ΔF^0 kcal/M	P
Dicumarol	4,5	95,5	69,6	5,5	379,3	-7,80	125,0
Ethylbiscoumacetat	14,8	85,2	54,4	2,4	130,6	-7,73	21,6
Phenprocoumon	15,6	84,4	39,6	2,4	95,0	-7,56	18,0
Warfarin-Natrium	28,9	71,1	16,3	2,2	35,9	-7,02	10,5
Acenocoumarol	43,3	56,7	8,4	1,7	13,9	-6,61	8,3

Über den Sättigungsgrad des Albuminmolekuls erhält man Aufschluß, wenn man das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ gegen die freie Substanzkonzentration c_f aufträgt (Abb. 3). Die Bindungskurven für Acenocoumarol, Warfarin-Natrium, Phenprocoumon und Ethylbiscoumacetat scheinen im hohen Konzentrationsbereich einem Plateau zuzustreben, während das spezifische Bindungsvermögen für Dicumarol in dem untersuchten Konzentrationsbereich proportional der freien Konzentration ansteigt.

Verteilungskoeffizient der Cumarinderivate

Der Verteilungskoeffizient der untersuchten Substanzen nimmt in der Reihenfolge ihrer Bindung an Albumin zu (Tab. 3). Gegenüber Acenocoumarol, Warfarin-Natrium, Phenprocoumon und Ethylbiscoumacetat nimmt im Falle von Dicumarol der Verteilungskoeffizient stärker zu als die Bindungskonstante K (Abb. 4, Tab. 3).

Dagegen ist die Gesamtbindung (Assoziationskonstante $K \times$ Anzahl der Bindungsstellen n) für alle untersuchten Substanzen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten linear korreliert (Abb. 5).

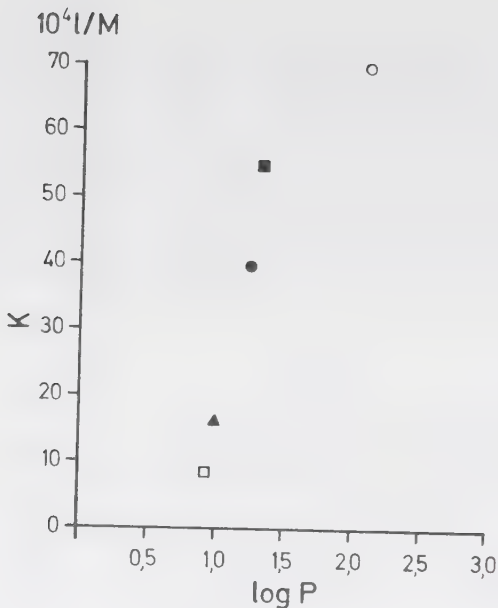


Abbildung 4

Beziehung zwischen Albuminbindung und Lipoidlöslichkeit der Cumarinderivate. Abhängigkeit der Bindungskonstante K (Ordinate) vom Logarithmus des Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten (Abszisse). o Dicumarol, ■ Ethylbiscoumacetat, ● Phenprocoumon, ▲ Warfarin-Natrium, □ Acenocoumarol.

Die Verteilungskoeffizienten sind die Mittelwerte aus 24 Bestimmungen (für Dicumarol 16 Bestimmungen), siehe Tab. 4. Bindungskonstanten vergleiche Abb. 2.

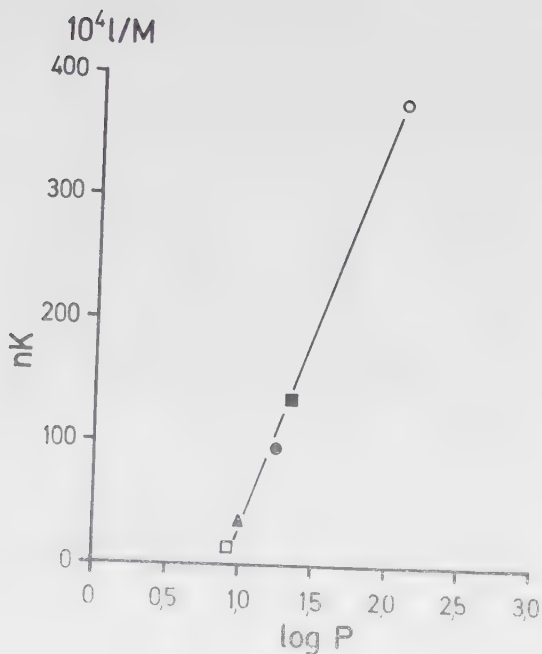


Abbildung 5

Beziehung zwischen Albuminbindung und Lipoidlöslichkeit der Cumarinderivate. Abhängigkeit des Gesamtbindungsvermögens nK (Ordinate) von dem Logarithmus des Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten (Abszisse).

○ Dicumarol, ■ Ethylbiscoumacetat, ● Phenprocoumon, ▲ Warfarin-Natrium, □ Acenocoumarol.

Die Verteilungskoeffizienten sind die Mittelwerte aus 24 Bestimmungen (für Dicumarol 16 Bestimmungen), siehe Tab. 4.

Bindungskonstanten vergleiche Abb. 2.

Tabelle 4

Verteilungskoeffizient (P) der Coumarinderivate. Die Werte sind Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 4 Bestimmungen und die Standardabweichung der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$)

c	Acenocoumarol	Phenprocoumon	Warfarin-Natrium	Ethylbiscoumacetat	Dicoumarol
$10^{-4}M$					
0,1	$11,3 \pm 0,9$	$17,7 \pm 1,3$	$10,9 \pm 3,1$	$22,0 \pm 1,6$	$131,3 \pm 16,4$
0,2	$8,0 \pm 0,7$	$20,3 \pm 1,4$	$11,1 \pm 1,5$	$23,5 \pm 0,1$	$138,0 \pm 9,7$
0,4	$8,6 \pm 0,5$	$18,2 \pm 1,1$	$10,8 \pm 0,8$	$22,4 \pm 0,5$	$119,3 \pm 11,0$
0,8	$7,3 \pm 0,2$	$17,3 \pm 0,7$	$10,6 \pm 0,4$	$21,0 \pm 0,7$	$111,4 \pm 5,3$
1,2	$7,0 \pm 0,4$	$17,7 \pm 0,8$	$10,2 \pm 0,3$	$20,4 \pm 0,2$	
1,6	$6,6 \pm 0,4$	$16,9 \pm 0,5$	$9,9 \pm 0,2$	$20,6 \pm 0,6$	

Statistische Auswertung der Ergebnisse

Bei Anwendung der Rangvarianzanalyse nach FRIEDMAN (FRIEDMAN, 1937) ergaben sich in dem gesamten untersuchten Konzentrationsbereich sowohl für die Eiweißbindung der Cumarinderivate (angegeben als prozentualer Anteil an freiem Arzneimittel) als auch für den Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten signifikante Unterschiede auf dem 1 % Niveau.

Der anschließend durchgeführte Test nach WILCOXON (WILCOXON, F., WILCOX, R.A., 1964) ergab folgende Ergebnisse:

a) Eiweißbindung (siehe Tab. 3, Tab. 5)

In dem untersuchten Konzentrationsbereich waren zwischen Dicumarol und Acenocoumarol statistisch auffällige Unterschiede ($p < 0,05$) in der freien Arzneimittelkonzentration α vorhanden.

b) Octanol-Puffer-Verteilungskoeffizient (siehe Tab. 4)

Bei einer Arzneimittelkonzentration von $10^{-5}M$ waren statistisch auffällige Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen Warfarin-Natrium und Ethylbiscoumacetat nachweisbar.

In dem Konzentrationsbereich von $0,2 \cdot 10^{-4}M$ bis $1,6 \cdot 10^{-4}M$ ergaben sich zwischen Acenocoumarol und Ethylbiscoumacetat signifikante Unterschiede ($p < 0,01$). Dagegen waren zwischen Warfarin-Natrium und Ethylbiscoumacetat in diesem Konzentrationsbereich keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar.

D i s k u s s i o n

Die untersuchten Cumarinderivate sind in unterschiedlichem Maße an Albumin gebunden. Der β Wert (Abb. 1), die Bindungskonstante (Abb. 2, Tab. 3) und die freie Reaktionsenergie (Tab. 3) nehmen in der Reihenfolge Acenocoumarol, Warfarin-Natrium, Phenprocoumon, Ethylbiscoumacetat und Dicumarol zu.

Die chemische Grundstruktur aller Cumarinderivate ist das 4 - Hydroxycumaringerüst. Nach dem Vorhandensein dieser Grundstruktur im Molekül unterscheidet man Mono- und Dicumarinderivate. Während die freie Reaktionsenergie der untersuchten Cumarinderivate -6,6 bis -7,8 kcal/Mol beträgt (Tab. 3), tritt bei der Bindung von Cumarin bereits eine freie Reaktionsenergie von -5,8 kcal/Mol auf. Diese nimmt durch die Einführung einer Hydroxylgruppe in Stellung 4, die für die gerinnungshemmende Wirkung erforderlich ist, noch um fast -0,9 kcal/Mol zu (O'REILLY, 1971). Der überwiegende Teil der Bindungsenergie wird demzufolge durch die Wechselwirkung des 4 - Hydroxycumaringerüsts mit dem Albuminmolekül geliefert.

Dicumarinderivate (Dicumarol, Ethylbiscoumacetat) besitzen demzufolge eine größere Affinität zum Albuminmolekül als Monocumarinderivate (Phenprocoumon, Warfarin-Natrium, Acenocoumarol).

Die Einführung eines esterartig gebundenen polaren Äthylacetatrestes in die Methylenbrücke des Dicumarinmoleküls führt im Falle des Ethylbiscoumacetat zu einer beträchtlichen Abnahme der Bindung (Abb. 2).

Wird ein 4 - Hydroxycumaringerüst durch einen Benzylrest ersetzt, so wird die Bindung weiter vermindert. Dabei führt die Substitution durch einen Phenylpropylrest (Phenprocoumon) zu einer geringeren Abnahme der Bindung, als die Substitution durch einen mehr polaren Acetonylbenzylrest (Warfarin) oder Nitrophenylrest (Acenocoumarin).

Es scheint demnach, daß mit dem Auftreten polarer Gruppen die Bindung der Cumarinderivate schwächer wird. Die Ladung dieser Arzneimittel sollte somit nicht die entscheidende Voraussetzung für deren feste Bindung sein. Untersuchungen der letzten Jahre weisen zunehmend auf die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln und Eiweißkörpern hin (HANSCH et al., 1965; KRIEGLSTEIN, et al., 1972). Aromatische Ringe sind an dieser Bindung maßgeblich beteiligt (JÄHNCHEN et al., 1969; KRIEGLSTEIN et al., 1972).

Um zu untersuchen, welche Bedeutung den hydrophoben Wechselwirkungen bei der Bindung der Cumarinderivate zukommt, wurde der Verteilungskoeffizient zwischen n-Octanol und Puffer bestimmt und mit der Albuminbindung in Beziehung gesetzt.

Dabei zeigte sich, daß mit steigendem hydrophoben Charakter dieser Substanzen auch die Albuminbindung zunimmt. (Tab. 3). Während für die Monocumarinderivate und Ethylbiscoumacetat die Affinitätskonstante K proportional dem Logarithmus ihres Verteilungskoeffizienten anzusteigen scheint, zeigt Dicumarol, verglichen mit seiner wesentlich größeren Lipoidlöslichkeit, eine geringere Zunahme der Bindungskonstante (Abb. 4).

Das Ausmaß der Bindung hängt aber nicht allein von der Affinität eines Pharmakons zum Eiweißmolekül ab, sondern auch von der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen. Diese scheinen ebenfalls mit steigender Lipophilie der Cumarinderivate zuzunehmen (Abb. 2, Tab. 3). Die Gesamtbindung ist somit das Produkt aus Bindungskonstante und der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen (SELLERS u. KOCH-WESER, 1970). Die Gesamtbindung aller untersuchten Cumarinderivate scheint linear mit dem Logarithmus ihres Verteilungskoeffizienten zuzunehmen (Abb. 5). Die höhere Gesamtbindung von Dicumarol ist im Gegensatz zu den übrigen Substanzen wesentlich auf die größere Anzahl von Bindungsstellen zurückzuführen (Tab. 3). Es ist bekannt, daß besonders bei Pharmaka, die eine große Affinität zum Eiweißmolekül besitzen, die Bindung gleichzeitig mit einer Änderung der Eiweißkonfiguration einhergeht (KLOTZ et al., 1952; KLOTZ u. AYERS, 1953; SCHOLTAN u. GLOXHUBER, 1968; FRANZ et al., 1969). Hierdurch können vorher maskierte Bindungsstellen an die Proteinoberfläche rücken.

Dieser kooperative Effekt scheint bei dem lipophileren Dicumarol mehr in Erscheinung zu treten als bei den übrigen Substanzen (Abb. 2, Tab. 3). Somit wird auch der steile Verlauf der Dicumarolbindungskurve in Abb. 3 verständlich. Während alle Monocumarinderivate und auch Ethylbiscoumacetat einem Sättigungszustand zustreben, steigt beim Dicumarol infolge der Zunahme der Bindungsstellen das spezifische Bindungsvermögen weiter mit steigender Konzentration an freier Substanz an.

Das Ausmaß der Albuminbindung der Cumarinderivate hängt somit wesentlich von ihrer Fähigkeit ab, hydrophobe Wechselwirkungen

mit dem Eiweißmolekül einzugehen. Mit steigender Lipoidlöslichkeit nimmt nicht nur die Affinität zum Albuminmolekül zu, sondern auch die Anzahl der Bindungsstellen. Neben den hydrophoben Wechselwirkungen dürfte auch mit dem Auftreten von ionogenen Bindungskräften zu rechnen sein. Diese könnten z. B. zwischen dem negativ geladenen Sauerstoff der Hydroxylgruppe in Stellung 4 des Cumaringerüsts und positiv geladenen Gruppen am Albuminmolekül ausgebildet werden. Dafür spricht auch die Zunahme der Albuminbindung von Cumarin nach dem Einführen einer phenolischen OH-Gruppe (O'REILLY, 1970).

Da die Reichweite einer Ionenbindung wesentlich größer ist als die der hydrophoben Wechselwirkungen, könnten Cumarinderivate zunächst durch ionogene Bindungskräfte am Albuminmolekül gebunden werden. Dadurch verringert sich der Abstand zwischen Cumarin- und Albuminmolekülen soweit, daß nun hydrophobe Wechselwirkungen in Erscheinung treten können. Die weitere Bindung dürfte dann weitgehend von dem Ausmaß der hydrophoben Wechselwirkungen abhängen.

Der Arzneimittel-Albuminkomplex wird oft als ein Modell betrachtet, das möglicherweise auch Rückschlüsse auf die Bindung von Pharmaka an intrazelluläre Rezeptoren und Enzymsysteme zuläßt (HACKENBERG u. KRIEGLSTEIN, 1972, KRIEGLSTEIN et al., 1972). Sowohl der Cumarinrezeptor als auch das cumarinabbauende Enzymsystem befinden sich in der Leber. Innerhalb der Gruppe der Mono- und Dicumarinderivate ist sowohl die Wirksamkeit als auch die Geschwindigkeit der Elimination dem Ausmaß ihrer Bindung an Albumin korreliert (BRODIE et al., 1952; BLATRIX et al., 1968; O'REILLY et al., 1964; SEILER u. DUCKERT, 1968; COON u. WILLIS, 1970). Keine Korrelation ergibt sich, wenn man alle Cumarinderivate in dieser Hinsicht

vergleicht. So wird das stärker an Albumin gebundene Dicumarinderivat Ethylbiscoumacetat wesentlich schneller eliminiert (biologische Halbwertszeit von 2 Stunden; BRODIE et al., 1952) als das schwächer an Albumin gebundene Monocumarinderivat Phenprocoumon (biologische Halbwertszeit von 6,5 Tagen; SEILER u. DUCKERT, 1968).

Jedoch hängt die in vivo ermittelte Wirksamkeit und Elimination nicht nur von der Affinität dieser Arzneimittel zum Rezeptor oder Enzymsystem ab, sondern auch von der Verteilung dieser Arzneimittel zwischen Blut und Leber. Diese wiederum ist neben anderen Faktoren sowohl eine Funktion der Plasmaalbuminbindung als auch der Permeationsfähigkeit durch biologische Membranen. Mit steigender Lipidlöslichkeit der Pharmaka nimmt sowohl die Plasmaalbuminbindung als auch die Permeationsfähigkeit zu (JÄHNCHEN et al., 1971). Es wäre vorstellbar, daß bei den Dicumarinderivaten infolge ihrer größeren Lipidlöslichkeit die Permeationsfähigkeit gegenüber der Albuminbindung an Bedeutung gewinnt, wogegen bei den Monocumarinderivaten umgekehrte Verhältnisse gelten könnten. Insofern läßt die fehlende Korrelation zwischen den in vitro gemessenen Bindungsdaten und den in vivo gewonnenen Parametern nicht den Schluß zu, daß für den Arzneimittel-Rezeptor-Komplex andere Gesetzmäßigkeiten gelten als für den Arzneimittel-Albuminkomplex.

Tabelle 5

Bindungsvermögen einer Albuminlösung ($5 \times 10^{-5} M$) für Cumarinderivate. Angegeben sind c , d , c_f , c_g , $\bar{r}$, $\bar{r}/c_f$ (Definitionen siehe Tab. 2). Die Werte sind Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 3 - 5 Bestimmungen und die Standardabweichung der Mittelwerte (s_x).

Acenocoumarol ($N = 3$)

c $10^{-4} M$	d %	c_f $10^{-4} M$	c_g $10^{-4} M$	$\bar{r}$ $10^{-4} M$	$\bar{r}/c_f$ $10^{-4} M$
0,2	$20,67 \pm 0,70$	$0,041 \pm 0,001$	$0,160 \pm 0,002$	$0,318 \pm 0,003$	$7,715 \pm 0,333$
0,4	$27,13 \pm 0,64$	$0,109 \pm 0,003$	$0,292 \pm 0,003$	$0,584 \pm 0,005$	$5,384 \pm 0,173$
0,6	$36,27 \pm 0,32$	$0,217 \pm 0,002$	$0,383 \pm 0,002$	$0,765 \pm 0,004$	$3,516 \pm 0,048$
0,8	$38,37 \pm 0,43$	$0,307 \pm 0,004$	$0,493 \pm 0,004$	$0,974 \pm 0,019$	$3,214 \pm 0,057$
1,0	$43,27 \pm 0,94$	$0,433 \pm 0,009$	$0,567 \pm 0,009$	$1,135 \pm 0,019$	$2,627 \pm 0,103$
1,5	$52,00 \pm 1,87$	$0,780 \pm 0,028$	$0,720 \pm 0,028$	$1,440 \pm 0,056$	$1,856 \pm 0,136$

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Warfarin-Natrium (N = 4)

c $10^{-4}M$	α %	c_f $10^{-4}M$	c_g $10^{-4}M$	$\bar{r}$ $10^{-4}M$	$\bar{r}/c_f$ $10^{-4}M$
0,2	$12,88 \pm 0,95$	$0,026 \pm 0,002$	$0,174 \pm 0,002$	$0,349 \pm 0,004$	$13,776 \pm 1,155$
0,4	$15,30 \pm 0,61$	$0,061 \pm 0,002$	$0,337 \pm 0,005$	$0,678 \pm 0,005$	$11,171 \pm 0,481$
0,6	$17,63 \pm 1,65$	$0,106 \pm 0,010$	$0,494 \pm 0,010$	$0,989 \pm 0,020$	$9,654 \pm 1,097$
0,8	$23,05 \pm 1,79$	$0,185 \pm 0,015$	$0,618 \pm 0,013$	$1,231 \pm 0,029$	$6,827 \pm 0,659$
1,0	$28,93 \pm 2,69$	$0,289 \pm 0,027$	$0,711 \pm 0,027$	$1,421 \pm 0,054$	$5,024 \pm 0,599$
1,5	$38,77 \pm 1,19$	$0,582 \pm 0,018$	$0,918 \pm 0,018$	$1,836 \pm 0,008$	$3,164 \pm 0,161$

1
2
1

Phenprocoumon (N = 5)

0,2	$6,05 \pm 0,53$	$0,012 \pm 0,000$	$0,187 \pm 0,001$	$0,375 \pm 0,002$	$31,541 \pm 2,907$
0,4	$6,35 \pm 0,74$	$0,025 \pm 0,003$	$0,376 \pm 0,005$	$0,749 \pm 0,006$	$30,739 \pm 3,779$
0,6	$8,88 \pm 0,57$	$0,053 \pm 0,003$	$0,546 \pm 0,003$	$1,093 \pm 0,007$	$20,678 \pm 1,666$
0,8	$11,90 \pm 0,63$	$0,095 \pm 0,005$	$0,704 \pm 0,005$	$1,408 \pm 0,010$	$14,900 \pm 0,959$
1,0	$15,60 \pm 1,84$	$0,156 \pm 0,018$	$0,843 \pm 0,018$	$1,687 \pm 0,369$	$11,342 \pm 1,622$
1,5	$23,40 \pm 1,45$	$0,351 \pm 0,019$	$1,148 \pm 0,019$	$2,296 \pm 0,038$	$6,600 \pm 0,449$

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Dicumarol (N = 3)					
c	α	c_f	c_g	$\bar{r}$	$\bar{r}/c_f$
$10^{-4}M$	%	$10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$10^{-4}M$	$10^{-4}M$
0,2	3,20 $\pm$ 0,14	0,006 $\pm$ 0,000	0,194 $\pm$ 0,000	0,387 $\pm$ 0,001	60,687 $\pm$ 0,238
0,4	3,07 $\pm$ 0,15	0,012 $\pm$ 0,001	0,388 $\pm$ 0,001	0,776 $\pm$ 0,001	63,748 $\pm$ 0,349
0,6	3,30 $\pm$ 0,24	0,020 $\pm$ 0,002	0,580 $\pm$ 0,002	1,160 $\pm$ 0,003	59,321 $\pm$ 0,486
0,8	4,02 $\pm$ 0,130	0,032 $\pm$ 0,001	0,768 $\pm$ 0,001	1,536 $\pm$ 0,002	47,849 $\pm$ 0,166
1,0	4,55 $\pm$ 0,20	0,049 $\pm$ 0,002	0,955 $\pm$ 0,002	1,909 $\pm$ 0,004	42,164 $\pm$ 0,198
1,5	5,49 $\pm$ 0,19	0,082 $\pm$ 0,003	1,418 $\pm$ 0,003	2,835 $\pm$ 0,006	34,511 $\pm$ 0,126
Ethylbiscoumacetat (N = 3)					
0,2	3,94 $\pm$ 0,32	0,008 $\pm$ 0,001	0,192 $\pm$ 0,001	0,386 $\pm$ 0,001	29,300 $\pm$ 0,416
0,4	5,33 $\pm$ 0,44	0,021 $\pm$ 0,002	0,378 $\pm$ 0,002	0,767 $\pm$ 0,004	36,039 $\pm$ 0,330
0,6	6,64 $\pm$ 0,45	0,040 $\pm$ 0,003	0,560 $\pm$ 0,003	1,120 $\pm$ 0,005	28,441 $\pm$ 0,213
0,8	9,66 $\pm$ 0,44	0,077 $\pm$ 0,004	0,723 $\pm$ 0,004	1,446 $\pm$ 0,007	18,739 $\pm$ 0,093
1,0	14,80 $\pm$ 0,84	0,148 $\pm$ 0,008	0,852 $\pm$ 0,008	1,704 $\pm$ 0,018	11,603 $\pm$ 0,079
1,5	23,37 $\pm$ 0,94	0,348 $\pm$ 0,014	1,153 $\pm$ 0,015	2,305 $\pm$ 0,028	6,641 $\pm$ 0,038

Z U S A M M E N F A S S U N G

Mit Hilfe der Sephadexgelfiltration wurde die Albuminbindung von Acenocoumarol, Warfarin-Natrium, Phenprocoumon, Ethylbiscoumacetat und Dicumarol bestimmt. Die Bindung dieser Pharmaka an Albumin wurde durch den prozentualen Anteil α an freier bzw. β an gebundener Substanz, die Bindungskonstante K, die freie Reaktionsenergie ΔF und die Anzahl n der Bindungsstellen pro Albuminmolekül charakterisiert. Das Ausmaß der Albuminbindung und die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen am Albuminmolekül nahmen in der Reihenfolge Acenocoumarol, Warfarin-Natrium, Phenprocoumon, Ethylbiscoumacetat und Dicumarol zu. Dicumarinderivate zeigten eine größere Affinität zum Albuminmolekül als Monocoumarinderivate.

Die Anwendung der Rangvarianzanalyse nach FRIEDMAN ergab signifikante Unterschiede im prozentualen Anteil an freier Konzentration dieser Arzneimittel. Jedoch ließen sich infolge der geringen Fallzahl bei dem anschließend durchgeführten Test nach WILCOXON diese Unterschiede in der Albuminbindung nur zwischen Acenocoumarol und Dicumarol nachweisen.

Der Verteilungskoeffizient dieser Substanzen zwischen n-Octanol und Puffer nahm in der gleichen Reihenfolge zu wie die Albuminbindung. Statistisch signifikante Unterschiede im Verteilungskoeffizienten der untersuchten Arzneimittel ließen sich mit dem Test nach WILCOXON zwischen Ethylbiscoumacetat und Acenocoumarol nachweisen. Das Gesamtbindungsvermögen (Produkt aus Bindungskonstante K und Anzahl der Bindungsstellen n am Albuminmolekül) scheint für alle untersuchten Substanzen linear mit dem Logarithmus ihres Verteilungskoeffizienten anzusteigen.

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß hydrophobe Wechselwirkungen maßgeblich an der Albuminbindung dieser Pharmaka beteiligt sind. Mit dem Ausmaß dieser Wechselwirkungen scheint einerseits die Affinität dieser Pharmaka zum Albuminmolekül zuzunehmen, andererseits auch der Grad der Konfigurationsänderung am Albuminmolekül, der zum Auftreten neuer Bindungsstellen führt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ALY, F.W., BRAUN, H.J., HADAM, W.R., KALLE, E.:

Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion.
Arzneimittel-Forsch. 18, 1467-1482 (1968)

ANTON, H.H.:

The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficacy.

J. Pharmac. exp. Ther. 129, 282-290 (1960)

ANTON, H.H.:

A drug induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides.

J. Pharm. exp. Ther. 134, 291-303 (1961)

ANTON, H.H.:

Alteration of the acetylation of sulfonamides by protein binding, sulfinpyrazone, and suramine.

Canad.J. Pharmac. 42, 809 (1964)

BIRD, A.E., MARSHALL, A.C.:

Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients.

Biochem. Pharmacol. 16, 2275-2290 (1967)

BLATRIX, C., CHARONNAT, S., TILLEMENT, J.P., ISRAEL, J.,

BREVET, J.P., DEBRAUX, J., MERLIN, M.:

Metabolisme chez l'homme du dérivé de la 4-hydroxycoumarine:3 (a-acétonyl-p-nitrobenzyl) 4-hydroxycoumarine (Sintrom) Rev. Fr. Etud.

Clin. Biol., 13, 984-995 (1968)

- BRODIE, B.B., WEINER, M., BURNS, J.J., SIMSON, G., YALE, E.K.:
Pysiological disposition ethyl-bis-coumacetate
(Tromexan) in man and a method for its estimation in
biological material.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 106, 453-463 (1952)
- BRODIE, B.B., HOGBEN, C.A.M.:
Some physico-chemical factors in the drug action.
J.Pharm. Pharmacol. 2, 345-380 (1957)
- BRODIE, B.B.:
Displacement of one drug by another from carrier
or receptor sites.
Proc. Roy. Soc. Med. 58, 946-955 (1965)
- BRODIE, B.B.:
Physico-chemical and biochemical aspects of
pharmacology.
J. Am. Med. Ass. 202, 600-609 (1967)
- BUNGER, P., KOCH, G.:
Klinische Untersuchung mit 2-Sulfanilamido-5-methoxy-
pyrimidin.
Arzneimittelforsch. 11, 726-737 (1961)
- CHIGNELL, C.F.:
Optical studies of drug protein complexes. 4.
The interaction of warfarin and dicoumarol with
human serum albumin.
Molec. Pharmacol. 6, 1-12 (1970)

CHO, M.J., MITCHELL, A.G., PERNAROWSKI, M.:

Interaction of bishydroxycoumarin with human serum albumin.

J. Pharm. Sci. 60, 196-200 (1971)

COON, W.W., WILLIS, P.W.:

Some aspects of the pharmacology of oral anti-coagulants.

Clin. Pharmacol. Ther. 11, 312-336 (1970)

DESGREZ, P., DE TRAVERSE, P.M.:

Transport function of plasma proteins.

Amsterdam - London - New York: Elsevier

Publishing Company 1966

DETTLI, L.:

Der Konzentrationsbegriff in der Chemotherapie mit Sulfanilamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11, 861-866 (1961)

DETTLI, L., BAUER, M., SPRING, P.:

Über die Eiweißbindung der Sulfanilamide in vitro und in vivo.

Chemotherapie 6, 196-205 (1963)

FRANZ, J.W., JÄHNCHEN, E., KRIEGLSTEIN, J.:

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp.

Path. 264, 462-475 (1969)

FRIEDMAN, M.:

The use of ranke to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance.

J.Amer: Statist. Ass. 32, 675-701 (1937)

zitiert nach:

LOTHAR SACHS, Statistische Auswertungsmethoden,
2. Auflage 1969, Stuttgart

GARDEN, S., WOISILAIT, W.D.:

Comparative study of the binding of coumarin anticoagulants and serum albumins.

Biochem. Pharmacol. 20, 1661-1668 (1971)

GOLDSTEIN, A.:

The interaction of drugs and plasma proteins.

Pharmacol. Rev. 1, 102-165 (1949)

HACKENBERG, H., KRIEGLSTEIN, J.:

Comparative study on the inhibition of Na^+ , K^+ -activated ATPase activity by chlorpromazine, promazine, imipramine, and their monodesmethyl metabolites.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 274, 63-73 (1972)

HANSCH, C., MALONEY, P.P., FUJITA, T.:

Correlation of biological activity of phenoxy-acetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients.

Nature (Lond.) 194, 178-180 (1962)

HANSCH, C., KIEHS, K., LAWRENCE, G.L.:

The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins.

J. Am. chem. Soc. 87, 5770-5773 (1965)

HOFMANN, P., KRIEGLSTEIN, J., MUTSCHLER, E., WOLLERT, U.:

Die Bestimmung der Eiweißbindung einiger Guanyldihydrazone mit Hilfe der Sephadexgelfiltration.
Arzneimittel-Forsch. 20, 681-684 (1970)

JAHNCHEN, E., KRIEGLSTEIN, J., KUNKEL, F., SAMUELIS, W.J., WOLLERT, U.:

Die Bedeutung der Bindung von Pharmaka an Albumin und Erythrozyten eines Perfusionsmediums der isolierten Rattenleber.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 269, 67-84 (1971)

KLOTZ, J.M., BURKHARD, R.K., URQUART, J.M.:

Structural specificities in the interactions of some organic ions with serum albumin.
J. Amer. chem. Soc. 74, 202-208 (1952)

KLOTZ, J.M., AYERS, J.:

Protein interaction with organic molecules.
Discuss. Faraday Soc. 13, 189-196 (1953)

KRIEGLSTEIN, J., KUSCHINSKY, G.:

Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka durch Gelfiltration.
Arzneimittel-Forsch. 18, 287-289 (1968)

KRIEGLSTEIN, J.:

Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.
Klin. Wschr. 47, 1125-1130 (1969a)

KRIEGLSTEIN, J.:

Über die Wechselwirkung der Plasma- und Gewebsproteinbindung von Promazin, untersucht an der isoliert perfundierten Rattenleber.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 474-483 (1969b)

KRIEGLSTEIN, J., MEILER, W., STAAB, J.:

Hydrophobic and ionic interactions of phenothiazine derivatives with bovine serum albumin.
Biochem. Pharmacol. 21, 985-997 (1972)

MEYER, M.C., GUTTMAN, D.E.:

The binding of drugs by plasma proteins.
J. Pharm. Sci. 57, 895-918 (1968)

NEWBOLD, B.B., KILPATRICK, P.:

Long acting sulphonamides and protein-binding.
The Lancet 1960, I, 887

O'REILLY, R.A., AGGELER, P.M., LEONG, L.S.:

Studies on the coumarin anticoagulant drugs:
comparison of the pharmacodynamics of dicumarol
and warfarin in man.
Thromb. Diath. Haemorrh., 11, 1-22 (1964)

O'REILLY, R.A.:

Interaction of the anticoagulant drug warfarin
and its metabolites with human plasma albumin.
J. Clin. Invest. 48, 193-202 (1969)

O'REILLY, R.A.:

Determinants of the response to oral anticoagulant drugs in man.
Pharmacol. Rev. 22, 35-96 (1970)

O'REILLY, R.A.:

Interaction of several coumarin compounds
with human and canine plasma albumin.
Molec. Pharmacol. 7, 209-218 (1971)

PORTWICH, F., BÜTTNER, H.:

Die Bedeutung der Serumeiweißbindung von Sulfonamiden für die Nierenausscheidung.

Helv. physiol. pharmac. Acta 19, C. 99-101 (1961)

PRESCOTT, L.E.:

Pharmacokinetic drug interactions.

The Lancet 1969, II, 1239-1243

SCATCHARD, G.:

The attractions of proteins for small molecules and ions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)

SCHOLTAN, W.:

Bestimmungsmethoden und Gesetzmäßigkeiten der Eiweißbindung von Sulfonamiden und Penicillinen.

Chemotherapie 12, 103-134 (1964)

SCHOLTAN, W., GLOXHUBER, C.:

Die Eiweißbindung von Bilirubin und Bromsulfalein
Arzneimittel-Forsch. 16, 520-528 (1968)

SEILER, K., DUCKERT, F.:

Properties of 3-(1-phenyl-propyl)-4-oxycoumarin
(Marcoumar^(R)) in the plasma when tested in normal
cases and under the influence of drugs.

Tromb. Diath. Haemorrh., 19, 389-396, 1968

SELLERS, E.M., KOCH - WESER, J.:

Displacement of warfarin from human albumin by
diazoxide and ethacrynic, mefenamic and naldixic acids.

Clin. Pharmacol. Ther. 11, 524-529 (1970)

THORP, J-M.; in:

Absorption and distribution of drugs. (T.B.
Binns, ed.) pp. 64. Edinburgh:Livingstone 1964

WEINER, M., BRODIE, B.B., BURNS, J.J.:

A comparative study of hypoprothrombinemic
pharmacology of cumarin and indanione
compounds.

in:

Thrombosis and Embolism

I. International Conference on Thrombosis
and Embolism, Basel 1954

Seite 181-193, Benno Schwabe und Co., Basel

WILCOXON, F., WILCOX, R.A.:

Some rapid approximate statistical procedures,
Lederle Laboratories, Pearl River, N.Y. 1964, pp. 36-38
zitiert nach:

LOTHAR SACHS, Statistische Auswertungsmethoden,
2. Auflage 1969

WITZGALL, H.:

Die Blut-Liquorverteilung von Arzneimitteln an dem
Beispiel der gebräuchlichsten Sulfonamide.
Ärztl. Wschr. 8, 643 (1953)

WITZGALL, H., BOYENS, H.:

Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzel-
len und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung
von Arzneimitteln.

Arch. int. Pharmacodyn. 148, 511-535 (1964)

LEBENS LAUF

Am 19. 1. 1947 wurde ich, Holger Stamm, in Salzgitter-Bad geboren. Dort besuchte ich von 1953 bis 1957 die Grundschule und wechselte 1957 zum dortigen Gymnasium. Bedingt durch Wohnungswechsel besuchte ich 1958 das Gymnasium in Neumünster und von 1959 bis 1966 das Gymnasium in Zeven. 1966 bestand ich hier die Reifeprüfung.

Das Studium der Zahnheilkunde begann ich 1966 an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 1967 legte ich hier die Naturwissenschaftliche Vorprüfung ab und 1969 die Ärztliche Vorprüfung. Von 1970 an arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Universität Mainz an meiner Dissertation. Das zahnmedizinische Staatsexamen bestand ich 1972.

Anschließend wurde ich zur Ableistung meines Grundwehrdienstes zur Bundeswehr einberufen, wo ich bis zum Februar 1974 als Stabsarzt in Hannover arbeitete.

Seit dem 1. 4. 1974 habe ich eine Stelle als zahnärztlicher Assistent in einer Praxis in Wolfenbüttel.

SOFORTDRUCK BRAUNSCHWEIG